**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**

HERTON RODRIGO TAVARES COSTA

**Estudo experimental dos efeitos neurotóxicos da
terapia fotodinâmica**

**RIBEIRÃO PRETO
2015**

HERTON RODRIGO TAVARES COSTA

**Estudo experimental dos efeitos neurotóxicos da
terapia fotodinâmica**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade
de São Paulo para obtenção do **Título de
Mestre em Ciências.**

Orientador: Prof. Dr. Helton Luiz
Aparecido Defino

VERSÃO CORRIGIDA

RIBEIRÃO PRETO

2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial desta dissertação, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

FICHA CATALOGRÁFICA

Costa, Herton Rodrigo Tavares

Estudo experimental dos efeitos neurotóxicos da terapia fotodinâmica. Herton Rodrigo Tavares Costa - Ribeirão Preto, 2015.

62p.: 6il. 30 cm

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Área de Concentração: Ortopedia, Traumatologia e Reabilitação do Aparelho Locomotor.

Orientador: Defino, Helton Luiz Aparecido

1. Neurônios; 2. Fotoquimioterapia; 3. Dura-máter; 4. Azul de metileno; 5. Lasers.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aluno: Herton Rodrigo Tavares Costa

Título: Estudo experimental dos efeitos neurotóxicos da terapia fotodinâmica.

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do **Título de Mestre** em Ciências.

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Assinatura _____

Dedicatória

A DEUS, por me guiar em todos os meus passos.

À minha mãe, Osvaldina, e minha avó, Sidelcina, por todo amor e pela dedicação incondicional.

Ao meu pai, aos meus irmãos, Tiago, Fernanda e Rhaifa, e à minha namorada Cleide, pelo carinho e pela compreensão nos momentos de ausência.

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Helton Luiz Aparecido Defino, pelo exemplo de pessoa e profissional, pela amizade, pela confiança, pelas orientações pessoais e profissionais e pela oportunidade de realizar esse sonho.

Ao Profs. Drs. Fernando Herrero, Elaine Del Bel, Fernando Chahud, Antônio Tedesco e Altacílio Aparecido Nunes pelos conselhos e pela amizade, e às técnicas Célia e Vani, pelas orientações e préstimos nos momentos difíceis.

Às secretarias do Departamento de Biomecânica, Medicina e Reabilitação do Parelho Locomotor da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Maria de Fátima Feitosa de Lima, Elisângela Bernardi de Oliveira, Rosa Pereira Brittes Alves, Rita de Cássia Stela Cossalter e ao Ivan Barbosa, pela amizade e ajuda.

Aos meus amigos Alípio Aguiar Paiva, Carlos Eduardo Sólcia, Liliam Pacola, Mateus Antônio Estrella, Raphael Prandini e ao “grupo Almeidinhas”, pelo carinho e apoio em todas as decisões tomadas e por tornar as dificuldades menos árduas.

Aos pesquisadores Lucina Lopes, Lisinéia Zanardi, Paulo Bossini e Marília Mancini, integrantes do NUPEN (Núcleo de Pesquisa e Ensino de Fototerapia nas Ciências da Saúde, São Carlos, Brasil), pela cessão dos conhecimentos em fototerapia e pela viabilização de utilizar os equipamentos desenvolvidos.

*Que os vossos esforços desafiem as
impossibilidades, lembrai-vos de que as
grandes coisas do homem foram
conquistadas do que parecia impossível.*

Charles Chaplin

Resumo

COSTA, H.R.T. **Estudo experimental dos efeitos neurotóxicos da terapia fotodinâmica.** 62f. 2015. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2015.

Objetivo: Avaliar os efeitos da terapia fotodinâmica sobre as funções motoras do sistema nervoso e a dura-máter utilizando os fotossensibilizadores ftalocianina de cloro-alumínio e azul de metileno. **Materiais e Métodos:** Foram utilizados 56 ratos machos da raça Wistar, separados em dois grupos. Em um grupo os animais foram submetidos ao tratamento com terapia fotodinâmica (PDT) e em outro, o grupo controle, foram utilizados fotossensibilizadores sem a sua fotoativação. Os fotossensibilizadores foram aplicados sobre a dura-máter, após a realização de laminectomia, ao nível da T10. Os métodos de avaliação empregados foram a escala de avaliação funcional de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) e o estudo da dura-máter por meio da microscopia de luz. **Resultados:** Não foram observadas alterações nas atividades motoras dos animais submetidos à PDT, em relação ao grupo controle. As avaliações histológica e histopatológica não mostraram diferenças entre o grupo dos fotossensibilizadores ativados e o grupo controle, com relação ao processo inflamatório e à necrose tecidual. **Conclusão:** A PDT em conjunto com os fármacos fotossensibilizantes, ftalocianina de cloro-alumínio e azul de metileno não induziu efeitos neurotóxicos clínicos e/ou alterações histológicas sobre a dura-máter dos animais estudados.

Descritores: Neurônios, Fotoquimioterapia, Dura-Máter, Azul de metileno, Lasers.

Abstract

COSTA, H.R.T. **Experimental study of the neurotoxic effects of photodynamic therapy.** 62f. Dissertation (Master) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2015.

Objective: To determine the effects of photodynamic therapy on motor functional activity and the dura mater using the photosensitizers aluminum chloride phthalocyanine and methylene blue. **Material and Methods:** Fifty-six male Wistar rats were separated into two groups. In one group the animals were submitted to photodynamic therapy (PDT) and the control group was exposed to photosensitizers without their photoactivation. The photosensitizers were applied to the dura mater after laminectomy at the T10 level. The methods used for assessment were the Basso, Beattie and Bresnahan (BBB) functional evaluation scale and study of the dura mater by light microscopy. **Results:** No changes in motor activity were observed in the animals submitted to PDT compared to control. Histological and pathological evaluation did not show differences between the group exposed to activated photosensitizers and the control group regarding the inflammatory process and tissue necrosis. **Conclusion:** The joint use of PDT with the photosensitizing pharmaceuticals aluminum chloride phthalocyanin and methylene blue did not induce any clinical neurotoxic effects or histological changes in the dura mater of the animals studied.

Key words: Neurons, Photochemotherapy, Dura mater, Methylene blue, Lasers.

Lista de Figuras

- Figura 1:** Reação fotoquímica da terapia fotodinâmica (Adaptado de LUKSIENE, 2003)..... 33
- Figura 2:** Corte histológico corado com Hematoxilina **(A)** Eosina; **(B)** após incubação em diferentes amostras: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; **CIAIPc**= ftalocianina de cloro-alumínio e **AM+CIAIPc**= azul de metileno + ftalocianina de cloro-alumínio 44
- Figura 3:** Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica com Hematoxilina em biópsias **após incubação com diferentes amostras**: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; **AM+CIAIPc**= azul de metileno + ftalocianina de cloro-alumínio 44
- Figura 4:** Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica com Eosina em biópsias **após incubação com diferentes amostras**: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; **CIAIPc**= ftalocianina e **AM+CIAIPc**= azul de metileno + ftalocianina de cloro-alumínio 45
- Figura 5:** Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica com Hematoxilina em biópsias após **incubação com diferentes amostras e aplicação de LASER**: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; a **CIAIPc**= ftalocianina e **AM+CIAIPc**= azul de metileno+ftalocianina de cloro-alumínio 46
- Figura 6:** Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica com Eosina em biópsias após **incubação com diferentes amostras e aplicação de LASER**: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; a **CIAIPc**= ftalocianina e **AM+CIAIPc**= azul de metileno+ftalocianina de cloro-alumínio 46

Lista de Tabelas

Tabela 1:	Famílias de fotossensibilizadores com seus precursores químicos e as formulações comerciais (Adaptado de ALLISON et al., 2004) ...	25
Tabela 2:	Grupos experimentais do estudo	36
Tabela 3:	Escala de avaliação locomotora BBB (Basso, Beattie e Bresnahan).....	37
Tabela 4:	Etapas da inclusão dos tecidos para confecção das lâminas de histologia	39
Tabela 5:	Etapas da desparafinização dos tecidos para confecção das lâminas de histologia.....	40
Tabela 6:	Etapas da confecção das lâminas para análise histológica.....	40

Lista de Abreviaturas

$^1\text{O}_2$-	Oxigênio <i>singlete</i>
AM-	Azul de metileno
AT-	Azul de toluidina
BBB-	Escala de Basso, Beattie e Bresnahan
CIAIPc-	Ftalocianina de cloro-alumínio (do inglês <i>chloroaluminium phthalocyanine</i>)
DMSO-	Dimetilsulfóxido
DTG-	Droga de terceira geração
e6-	clorina
EROS-	Espécies reativas de oxigênio
FMRP-USP-	Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
HP-	Hematoporfirina
HPPH-	<i>2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a</i>
MP-	Membro posterior
mTHPC-	m-tetrahidroxifenilclorina
PDT-	Terapia fotodinâmica (do inglês <i>Photo Dynamic Therapy</i>)
PS-	Fotossensibilizador (do inglês <i>photosensitizer</i>)
SF-	Solução fisiológica

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Mecanismos de ação fotossensibilizadora utilizados na PDT	23
1.2. Tempo de pré-irradiação	27
 2. OBJETIVO	 29
 3. MATERIAIS E MÉTODOS	 31
3.1. Materiais.....	32
3.1.1. Hidrogel de azul de metileno	32
3.1.2. Hidrogel de ftalocianina de cloro-alumínio.....	32
3.1.3. Fonte de laser.....	33
3.1.4. Animais	33
3.2. Métodos.....	34
3.2.1. Anestesia.....	34
3.2.2. Procedimento cirúrgico.....	35
3.2.3. Protocolo de PDT	35
3.2.4. Grupos experimentais	36
3.2.5. Métodos de avaliação	37
3.2.5.1. Avaliação funcional dos animais	38
3.2.5.1.1. Escala de avaliação locomotora BBB (Basso, Beattie e Bresnahan).....	38
3.2.6. Avaliação histológica.....	40
3.2.7. Confeção das lâminas	40
3.2.8. Análise estatística	43
 4. RESULTADOS.....	 44
4.1. Avaliação funcional	45
4.2. Avaliação histológica.....	45
4.3. Avaliação histopatológica.....	48
 5. DISCUSSÃO	 49
 6. CONCLUSÃO	 54
 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	 56
 8. ANEXO.....	 62

1- Introdução

Os dados conceituais da Terapia Fotodinâmica (do inglês *Photo Dynamic Therapy* - PDT) começaram a ser descritos no século XX, quando os corantes, como a hematoporfirina (HP), foram utilizados associados à luz para o tratamento das lesões de pele (HAUSMAN, 1911). Na década de 1940, houve também relatos esporádicos do uso de porfirinas e da regressão dessas lesões, após a exposição à luz visível (FIGGE; WEILAND; MANGANIELLO, 1948).

A explosão do interesse e da aplicação da PDT moderna teve início com a descoberta do derivado de HP, por Lipson e Baldes, em 1960, e foi alimentada por estudos pioneiros, tanto de ciência básica como de aplicação clínica (DOUGHERTY et al., 1978, 1998).

A PDT consiste na foto-oxidação de materiais biológicos induzida por um fotossensibilizador (do inglês *photosensitizer* - PS), que se localiza seletivamente em determinadas células, que ao serem iluminadas com luz de comprimento de onda adequado e compatível, são destruídas pela criação de agentes citotóxicos que impedem o funcionamento normal de células ou organelas (LUKSIENE, 2003).

Recentemente, muitos estudos têm sido realizados para o desenvolvimento de novos PSs (KESSEL; THOMPSON, 1987; LUKSIENE, 2003), e no momento há grande número de substâncias PSs, com potencial utilização na PDT, sendo difícil decidir quais são adequadas para determinada doença ou aplicação. Alguns PSs podem ser facilmente preparados por síntese parcial, à partir de materiais naturais abundantes, tais como heme, clorofila e bacterioclorofila. Essa via apresenta vantagens, tanto econômicas quanto ambientais, em relação à complicada síntese química (BOYLE; DOLPHIN, 1996; KESSEL; THOMPSON, 1987; NYMAN; HYNNINEN, 2004).

Em paralelo aos avanços da química, há também muitas atividades direcionadas para o desenvolvimento de novas fontes de luz, incluindo lasers de fácil utilização, frequentemente baseados em diodos de estado sólido, bem como aqueles emissores de luz de baixo custo e filtros de lâmpadas de banda larga. Também os avanços no conhecimento da óptica têm permitido grandes melhorias no planejamento do tratamento e no entendimento da distribuição da luz dentro do tecido ou órgão-alvo e, portanto, otimização do resultado clínico. O

reconhecimento de que os diferentes tipos de tecidos possuem propriedades ópticas distintas, de que o mesmo tipo de tecido ou órgão pode variar acentuadamente entre os indivíduos e na forma como a luz é absorvida e dispersa, auxilia na escolha da fonte de luz apropriada (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

O fato de que a maioria dos PSs são também fluorescentes, bem como fotoquimicamente ativos, significa que as estratégias de detecção de imagem podem ser aplicadas nos protocolos da PDT. Essas técnicas são conhecidas como fotodetecção ou diagnóstico dinâmico. Os PSs podem ser utilizados para detectar a doença oculta, tais como displasia, delinear os limites de tumores, ou visualizar a doença em áreas inacessíveis, tais como esôfago, brônquios ou cólon, que podem ser alcançadas por via endoscópica. Outra aplicação de imagem fluorescente é para a quantificação e capacidade de melhorar a dosimetria da PDT, como por exemplo: medições de fluorescência podem ser realizadas para quantificar o PS na lesão do paciente antes de se decidir sobre os parâmetros de iluminação apropriados e também quantificar a fotodegradação do PS no tecido, que, em algumas circunstâncias, pode ser um marcador alternativo para o tratamento ideal. Embora os PSs sejam geralmente selecionados com base em considerações fotoquímicas e farmacocinéticas, a fluorescência pode ser um fator adicional a ser levado em conta, quando houver a necessidade de imagens (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Baseado na administração tópica ou sistêmica de um corante não tóxico fotossensível, seguida da irradiação de luz visível (DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005), e na presença do oxigênio encontrado nas células, o PS ativado pode reagir com moléculas da parede celular ou intracelular que podem levar essas células à morte, por lesão direta ou induzindo apoptose, e à destruição do tecido doente (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005; GAD et al., 2004).

O oxigênio *singlete* ($^1\text{O}_2$) reage com quase todos os componentes celulares, uma vez que, de modo geral, os compostos orgânicos insaturados são suscetíveis à ação de hidroperóxidos. Devido a pouca difusibilidade dos ânions através dos compartimentos celulares, os sítios celulares afetados serão aqueles

nos quais houve o acúmulo seletivo das drogas PSs (LAMBRECHTS et al., 2005a).

Como a primeira barreira para o $^1\text{O}_2$ é a membrana celular e esta contém lipídeos insaturados que podem ser danificados, esta reação pode inviabilizar a célula. Os hidroperóxidos resultantes podem levar à formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) por meio de reações catalíticas. Uma vez que a reatividade das EROS com as moléculas orgânicas não é específica, qualquer macromolécula dentro da célula pode ser um alvo em potencial para a PDT. Assim, a multiplicidade de alvos torna mais difícil para as células desenvolverem resistência, sendo essa uma das vantagens da fotossensibilização, além da morte celular (DOUGHERTY; MARCUS, 1992).

A morte celular caracterizada por necrose, em geral, está relacionada à presença de um agente agressor de alta intensidade. Nessa situação, os mecanismos básicos de defesa e escape celulares são ineficientes devido à grande intensidade do estímulo agressor, como o promovido pela formação de EROS após a aplicação da PDT. Uma das características marcantes da necrose é a alteração funcional em diferentes regiões subcelulares, com especial atenção às membranas biológicas que provocam a liberação dos conteúdos celulares e, conseqüentemente, perda de viabilidade. Associada à destruição das membranas celulares, ocorre a liberação de fosfolipídios de membrana e, portanto, a geração de intenso processo inflamatório decorrente dos produtos gerados na via da lipoxigenase (BUYTAERT; DEWAELE; AGOSTINIS, 2007).

A apoptose é uma modalidade de morte celular programada, que ocorre nos eventos fisiológicos e patológicos. Os eventos morfológicos observados nas células em apoptose são: a compactação nuclear, o empacotamento e a liberação de fragmentos citoplasmáticos e de organelas em microvesículas envoltas por membrana plasmática, os corpos apoptóticos. A liberação dessas vesículas contendo material celular são fagocitadas pelas células vizinhas, desencadeando processos inflamatórios em menor intensidade quando comparados aos processos relacionados à necrose (RICH; ALLEN; WYLLIE, 2000).

Além de ser utilizada no tratamento de lesões tumorais, de infecções bacterianas e virais, a PDT poderá tornar-se um novo tratamento adjuvante no

tratamento das lesões traumáticas da medula, uma vez que reduz a cicatriz glial e induz a proliferação celular (LI et al., 2011).

Uma vantagem adicional da PDT é que esse procedimento pode ser repetido várias vezes, pois não há efeitos tóxicos cumulativos e é um tratamento não invasivo e de baixo risco (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

1.1 Mecanismos de ação fotossensibilizadora utilizados na PDT

O princípio básico da PDT é a geração de agentes citotóxicos por meio da interação dinâmica entre um fármaco PS, excitado por luz em comprimentos de onda específicos, e uma biomolécula. A absorção de fótons pelos PSs gera a ativação desses fármacos, conduzindo essas moléculas a situações de grande instabilidade química, com mudança do padrão de organização eletrônica normal. A tendência natural de toda molécula com algum grau de excitação eletrônica é o retorno ao seu estado fundamental, pois é a condição mais estável. O retorno da molécula à estabilidade ocorre pela emissão de energia na mesma intensidade da energia de absorção do fóton pelo fármaco PS (LUKSIENE, 2003).

A absorção de fótons emitidos por irradiação a laser (Figura 1) pode levar à transformação do fármaco PS do seu estado fundamental a um estado excitado chamado de estado *singlete* que é instável e reativo. A partir dessa transformação inicial, o PS pode retornar ao seu estado fundamental liberando a energia de excitação em forma de fluorescência ou calor, ou passar a outro estado de excitação menos instável e mais reativo, denominado de estado “triplete”. A forma instável do PS gerada na reação pode interagir com qualquer biomolécula presente no meio (reação Tipo I), que se torna excitada e pode reagir com o oxigênio do meio, formando íons peróxidos, superóxidos e radicais hidroxilas, que geram uma cascata de EROs. Na reação tipo II, o PS excitado transfere sua energia diretamente para o oxigênio em seu estado fundamental, tornando-o também excitado, o $^1\text{O}_2$, também uma ERO (LUKSIENE, 2003), sem a necessidade de interagir com as biomoléculas celulares.

Figura 1: Reação fotoquímica da Terapia Fotodinâmica (Adaptado de LUKSIENE, 2003).

Os principais PSs estudados pertencem a diferentes grupos de compostos, como por exemplo, os xantenos halogenados (ex. Rosa de Bengala), fenotiazínicos (Ex. Azul de Toluidina AT e Azul de Metileno - AM), acridinas e conjugados de clorina (e6) (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Os estudos sobre a utilização de fenotiazinas na PDT têm se concentrado, predominantemente, no AM e seus análogos desmetilados (TARDIVO et al., 2005). Este, bem como outros compostos fenotiazínicos, têm sido amplamente utilizados por mais de um século para corar células e são empregados no diagnóstico clínico de diversas doenças e como marcador de tumor em cirurgias (WAINWRIGHT, 1996). Especificamente na cirurgia de coluna, é aplicado como marcador do disco intervertebral lesado.

Ao se eleger um PS específico, além das propriedades absorptivas, parâmetros como tempo de espera entre a administração do fármaco, iluminação da lesão e exposição a um tipo de luz específica são fatores determinantes para a

eficácia da PDT. Outros fatores como a polaridade, distribuição de cargas e propriedades de agregação dos PSs também devem ser considerados já que as reações químicas dependem das interações entre os tecidos e os fotoativos e das características do íons e cátions formados (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

O AM interage, predominantemente, com macromoléculas lipopolissacárides aniônicas, participando, assim, do processo de fotossensibilização. A absorção de luz pela maioria dos PSs é de curto alcance, o que a torna inacessível a lesões profundas. O emprego da técnica de veiculação nanoestruturada permitiu maior poder de alcance em tecidos mais profundos (CASTANO; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2005).

Classicamente, a literatura tem separado os grupos de PSs em gerações de fármacos, de acordo com o período cronológico de desenvolvimento. Nessa lógica, é possível citar os fármacos de primeira geração, desenvolvidos no final da década de 1970 e início de 1980, de segunda geração, na década de 1990, e ainda os de terceira geração (DTG), referentes a associações terapêuticas, como imunoterapia ou radiofototerapia (DEMIDNOVA; HAMBLIN, 2005).

Contrários a essa lógica cronológica, alguns autores têm classificado os PSs de acordo com semelhanças químicas entre os fármacos, agrupando-os em famílias de PSs. A justificativa é a falsa impressão de efetividade que a catalogação em gerações poderia criar. Na antiga classificação existia a impressão de que os fármacos de segunda geração seriam mais eficazes na PDT do que os de primeira geração, o que nem sempre é verdadeiro (ALLISON et al., 2004). Seguindo esta nova lógica, os PSs foram agrupados em três grandes famílias (Tabela 1).

Tabela 1: Famílias de fotossensibilizadores com seus precursores químicos e as formulações comerciais (Adaptado de ALLISON et al., 2004).

Família	Precursor Químico	Nome Comercial
Porfirinas	Derivados da hematoporfirina	Photofrin®
	ALA	Levulam®
	Vertipotfirina	Visudine®
Clorinas	Temoporfina	Foscan®
	Taloprofin	LS11®
	HPPH	Photochlor®
Ftalocianina	Alumínio-Sulfonada-Ftalocianina	Photosens®

ALA= ácido 5-aminolevulínico; **HPPH**= 2-[1-hexyloxyethyl]-2-devinyl pyropheophorbide-a.

A escolha de um PS para utilização na PDT envolve uma complexa análise de características até que se possa determinar qual a melhor opção para a PDT. Dentre os pontos a serem analisados, é possível citar: toxicidade e carcinogenicidade dos fármacos, seletividade pelas células alvo, possíveis efeitos adversos decorrentes de exposição à luz branca, via de administração, custos, capacidade de eliminação das drogas, comprimento de onda para ativação e efetividade clínica. A análise de todos esses fatores muitas vezes se torna complexa, porém estes devem ser considerados e um fator de efetividade calculado subjetivamente para justificar a escolha de um PS, entre as várias opções terapêuticas (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

Entre as famílias de PS, as ftalocianinas têm despertado grande interesse da comunidade científica. Estudos clínicos e pré-clínicos envolvendo essa droga têm apresentado resultados promissores para aplicação na PDT. Com grandes vantagens, as ftalocianinas são ativadas por luz em comprimentos de onda elevados (650-750 nm), o que confere maior poder de penetração, além de apresentarem baixa toxicidade quando empregadas na PDT (ALLISON et al., 2004). Outra importante característica dessa classe é a sua hidrofobicidade. Devido a essa característica química, esses fármacos necessitam de incorporação a sistemas de liberação de drogas específicos para que possam circular através do plasma sanguíneo (um exemplo é o lipossoma). Essas

estruturas são pequenas vesículas formadas por paredes fosfolipídicas com um compartimento aquoso no seu interior. Dessa forma, esse sistema pode carrear tanto estruturas lipofílicas (na parede) quanto hidrofílicas (interior) (ALLISON et al, 2004).

Além da capacidade de fluir livremente pelo plasma sanguíneo, a associação das ftalocianinas com lipossomas apresenta outras vantagens, como maior captação pelas células. A estrutura do lipossomo pode ser modificada pela adição de algumas substâncias como o colesterol. A presença desse lipídio na parede do lipossoma aumenta a captação dos fármacos pelos tecidos tumorais. Esse aumento se dá pelo fato de haver aumento de receptores de membrana com afinidade para colesterol. Essa característica química permite maior captação de PS pelas células neoplásicas (OLIVEIRA et al., 2006).

Estudos demonstraram a alta efetividade da ftalocianina de cloro-alumínio (CIAIPc) na destruição de células em culturas derivadas de carcinoma epidermóide bucal humano, evidenciando a baixa toxicidade do PS quando aplicado às células em cultura sem iluminação com laser (TAPAJÓS et al., 2008). Um PS ideal deve apresentar as seguintes características: alta seletividade pelas células alvo e alto nível de fototoxicidade para células e tecidos na área iluminada (BRANCALEON; MOSELEY, 2002).

1.2 Tempo de pré-irradiação

O tempo de pré-irradiação corresponde ao tempo decorrido entre a aplicação do PS no tecido alvo e sua ativação pela fonte de luz. É um dos pontos críticos para o sucesso da PDT, uma vez que, se o PS não estiver próximo ao alvo, sua ativação pela luz irá resultar na formação de espécies tóxicas em local não desejado (WAINWRIGHT, 1996). O tempo necessário para a absorção do corante antes da iluminação é importante para o sucesso da PDT. Nas aplicações da PDT antimicrobiana espera-se que o corante ultrapasse a barreira da membrana celular ou se una ao microrganismo e, nesse período, o PS não sofra degradação antes da ativação pela fonte de luz (MACHADO, 2000).

Não foram encontrados, na literatura consultada (Medline, SCOPUS, EBSCO, EMBASE, Web of Science), estudos que relatem a aplicação de PDT sobre os tecidos nervosos e suas membranas de revestimento como a dura-máter. Ao se utilizar os descritores isolados, os artigos encontrados não apresentaram correlação com o objetivo deste trabalho.

Para a busca desses estudos nas bases de dados foram cruzadas as palavras: *photochemotherapy and dura mater and methylene blue and lasers and neurons*. Além disso, não há relatos abordando, especificamente, a histologia e a fisiologia, ou evidência clínica da neurotoxicidade da PDT sobre a dura-máter.

2- Objetivo

O objetivo deste estudo foi avaliar, experimentalmente, os efeitos neurotóxicos da PDT, do AM e da CIAIPc (DTG) sobre as funções motoras do sistema nervoso e também os seus efeitos sobre a dura-máter, em ratos da raça Wistar.

3. Materiais e Métodos

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal-CETEA, da Faculdade de Medicina da Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), Processo nº 005/2014) (Anexo).

3.1 Materiais

3.1.1 Hidrogel de azul de metileno

O AM a 0,005% utilizado foi o Chimiolux 5 da DMC Equipamentos Ltda. O hidrogel foi obtido a partir da mistura aquosa estéril (250 mL) contendo um biopolímero da classe dos poloxamer de baixo peso molecular, adicionados, previamente, à solubilização do biopolímero, considerando o fator de diluição específico para cada concentração. O processo de gelificação foi realizado a -5°C em banho de gelo e agitação constante. A etapa de nanonização da formulação foi realizada utilizando-se um ultra-homogenizador de haste (Ultra-turrax) com velocidade de cisalhamento de 12.000 rpm. As amostras foram acondicionadas em refrigerador (-7°C). Os tamanhos de partículas de cada lote foram determinados, empregando-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz, a partir da análise da curva de distribuição de partículas.

3.1.2 Hidrogel de ftalocianina de cloro-alumínio

Primeiramente, preparou-se uma solução estoque de CIAIPc em dimetilsulfóxido (DMSO) a 0,1 mol/L, utilizando-se um banho ultrassônico para total homogeneização à temperatura ambiente. O hidrogel foi obtido a partir de uma mistura aquosa estéril (250 mL) contendo um biopolímero da classe dos poloxamer de baixo peso molecular. Os fotoativos foram adicionados, previamente, à solubilização do biopolímero, considerando o fator de diluição específico para cada concentração. O processo de gelificação foi realizado a -5°C em banho de gelo e agitação constante. A etapa de nanonização da formulação foi realizada utilizando-se um homogenizador de haste (Ultra-turrax) com

velocidade de cisalhamento de 12.000 rpm. As amostras foram acondicionadas em refrigerador (-7°C). Os tamanhos das partículas de cada lote foram determinados empregando-se a técnica de espalhamento dinâmico de luz, a partir da análise da curva de distribuição das partículas. Os lotes de hidrogel contendo AM, CIAIPc e mistura de CIAIPc+AM apresentaram tamanho médio de partículas de 180 nm, índice de polidispersão de 0,8 e potencial zeta de -13,5 mV. As amostras foram gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Antônio Cláudio Tedesco, do Laboratório de Fotobiologia e Fotomedicina, Centro de Nanotecnologia e Engenharia de Tecidos do Departamento de Química da Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FFCLRP-USP).

3.1.3 Fonte de laser

Foi utilizado o equipamento com fonte luz denominado Therapy XT, diâmetro da fibra: 600 µm, na frequência do vermelho: 660 nm ± 10 nm, potência 100 mW (Marca DMC Equipamentos, São Carlos, São Paulo Brasil), registrado na ANVISA sob nº 80030810100. O laser foi aplicado em contato com a dura-máter durante 90 segundos, sem causar compressão da medula. Os equipamentos de proteção individual (óculos de proteção e luvas estéreis) foram utilizados durante o procedimento. Após isso, a ferida foi lavada com solução fisiológica (SF) para remoção das substâncias em excesso.

3.1.4 Animais

Foram utilizados no estudo 56 ratos machos da raça Wistar, com peso corporal entre 250 e 300 gramas e idade entre 8-9 semanas, fornecidos pelo Biotério Central da FMRP-USP. Os animais foram mantidos, até o término do experimento, em gaiolas de polipropileno, medindo 20 x 40 cm (tipo C), com quatro animais/gaiola, alimentados com dieta padrão estabelecida pelo biotério e água *ad libitum*, com temperatura controlada (24±2°C), e com um ciclo claro/escuro de 12 x 12 horas, sendo o início do período claro às 6:00 horas. A

limpeza e manutenção das gaiolas foram realizadas três vezes por semana, seguindo a rotina do biotério.

Os critérios de inclusão dos animais foram a ausência de alteração da pelagem, sob visualização direta, e exame neurológico normal. Os critérios de exclusão foram a alterações na pelagem e o *déficit* neurológico.

O cálculo amostral foi realizado a partir de estudo piloto com oito ratos, no qual a escala de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB) foi 21 para todos e considerada a comparação entre médias populacionais (com variâncias iguais e desvio padrão de 1,6). Considerando-se que, neste estudo, a média esperada para os valores da BBB fosse 5% inferior à do grupo controle, seriam necessários sete ratos em cada grupo, totalizando 56 animais, sendo oito grupos, com nível de significância de 5% e poder de 80%.

3.2 Métodos

3.2.1 Anestesia

A anestesia utilizada para a realização do procedimento cirúrgico foi a mistura de Xilazina a 20 mg/mL e (0,7mL/100g) e Quetamina 50 mg/mL (1 mL/100g), que foi injetada via intraperitoneal, através da punção na parede abdominal do animal, com seringa descartável de 10 mL e agulha 25x7 mm para aplicação no abdome. Todos os procedimentos foram realizados sob técnica asséptica, com solução de PVPI alcoólica a 10%, para antissepsia dos animais. Para a analgesia transoperatória foi utilizada a seguinte substância: Flunixin Meglumine (Banamine) na dose 2,5 mg/kg (pela via intramuscular). Caso os animais apresentassem sinais de dor no pós-operatório, esta dose poderia ser repetida três horas após o procedimento cirúrgico.

3.2.2 Procedimento cirúrgico

Os animais foram anestesiados, após o que realizou-se a tricotomia em seu dorso com tricótomo elétrico, sem lesão do tegumento. Em seguida, foram posicionados em decúbito ventral e feita a antissepsia com solução de PVPI alcoólico, foi iniciado o procedimento com incisão na pele e no subcutâneo. Para a dissecação utilizou-se lâmina de bisturi nº 15 até a visualização dos processos espinhosos e das lâminas vertebrais, ao microscópio. A laminectomia foi realizada na região dorsal, no nível da T10, com o auxílio de instrumentais de microcirurgia e em seguida aplicados os respectivos fármacos em cada um dos grupos. No grupo B foram utilizados os fármacos supracitados acrescidos de *laser*. Após a aplicação do fármaco fotossensível, veiculado no meio adequado, e posterior ao tempo de espera preconizado para incorporação do ativo sobre o alvo biológico, a área onde foi realizada a laminectomia (no grupo B) foi irradiada com um *laser* de diodo semiconductor de baixa intensidade emitindo comprimento de onda fixo de 660 nm, com potência óptica útil de 100 mW, modelo Therapy XT, por meio de uma fibra óptica de diâmetro de 600 µm (marca DMC Equipamentos, São Carlos). As suturas da pele e do subcutâneo foram realizadas com fios de Nylon 4.0 e aplicada dose única de pentabiótico intramuscular na dosagem de 240.000 UI por kg de peso. Após a recuperação anestésica, os animais foram encaminhados ao Biotério nas suas respectivas gaiolas.

3.2.3 Protocolo de PDT

1. Aplicação de SF, solução de AM a 0,005%, CIAIPc, veiculada no meio, e AM a 0,005% + CIAIPc, veiculada no meio, nos respectivos grupos.
2. Tempo de espera de 5 minutos (tempo de pré-irradiação) foi adotado com base em estudos anteriores (LONGO; AZEVEDO, 2010; MAROTTI et al., 2013).
3. A seguir, no grupo B foi executada a irradiação da área com o *laser Therapy* operando no comprimento de onda de 660 nm, com Fluência = 320J/cm² ou 9J, por 90 segundos.

5. Após esse período, os agentes sensibilizantes foram removidos por lavagem simples com SF.

3.2.4 Grupos experimentais (Tabela 2)

A) Grupos tratados com PS - sem *laser*:

A1) Controle (SF): No grupo A1, realizou-se laminectomia dorsal em T10. Após a exposição da dura-máter, foi aplicado 1 mL de soro fisiológico, diretamente na região lesionada cirurgicamente.

A2) AM: Nesse grupo foi realizada laminectomia dorsal em T10. Após a exposição da dura-máter foram aplicados 0,3 mL da formulação com AM 0,05%, diretamente na região lesionada cirurgicamente.

A3) DTG (CIAIPc): No grupo A3, realizou-se laminectomia dorsal em T10. Após a exposição da dura-máter foram aplicados 0,3 mL da formulação com CIAIPc, diretamente na região lesionada cirurgicamente.

A4) AM + CIAIPc (Híbrido): Nesse grupo, foi realizada laminectomia dorsal em T10. Após a exposição da dura-máter foram aplicados 0,3 mL da formulação com AM e CIAIPc, diretamente na região lesionada cirurgicamente.

B) Grupo tratado com PSs e *laser*:

B1) Controle (SF) + LUZ: No grupo B1, realizou-se laminectomia dorsal em T10. Uma vez exposta a dura-máter, foi aplicado 1 mL de soro fisiológico diretamente sobre a região lesionada e após 5 minutos, aplicada a luz durante 90 segundos (*laser* com comprimento de onda apropriado, selecionado nas etapas anteriores).

B2) AM + LUZ: Nesse grupo foi realizada laminectomia dorsal em T10. Após exposta a dura-máter foram aplicados 0,3 mL da formulação com AM 0,05% diretamente sobre a região lesionada e após 5 minutos, aplicada a luz durante 90 segundos (*laser* com comprimento de onda apropriado, selecionado nas etapas anteriores).

B3) DTG (CIAIPc) + LUZ: No grupo B3 realizou-se laminectomia dorsal em T10. Após a exposição da dura-máter, foram aplicados 0,3 mL da formulação da DTG diretamente sobre a região lesionada e após 5 minutos, aplicada a luz durante 90 segundos (*laser* com comprimento de onda apropriado, selecionado nas etapas anteriores).

B4) AM + CIAIPc (Híbrido) + LUZ: No grupo B4 realizou-se laminectomia dorsal em T10. Após a exposição da dura-máter, foram aplicados 0,3 mL da formulação com AM + DTG diretamente sobre a região lesionada e após 5 minutos, aplicada a luz durante 90 segundos (*laser* com comprimento de onda apropriado, selecionado nas etapas anteriores).

Tabela 2. Grupos experimentais do estudo

Grupos			24 horas	7 dias	
Grupo A: Sem aplicação de Luz		Sem	Controle sem Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
			AM - sem Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
			DTG - Sem Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
			AM+DTG- sem Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
Grupo B: Com aplicação de Luz		Com	Controle+Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
			AM+Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
			DTG+Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
			AM+DTG + Luz (n=7)	Avaliação neurológica	Avaliação neurológica
Total			56 animais		

3.2.5 Métodos de avaliação

Os animais foram avaliados por meio da escala de avaliação locomotora de Basso, Beattie e Bresnahan (BBB), e avaliação histológica da dura-máter por meio da análise comparativa da contagem em pixels e avaliação histológica. A análise funcional foi realizada, a fim de se avaliar a função motora e detectar possíveis alterações da função neurológica. A avaliação histopatológica foi

realizada para observar as alterações histológicas (necrose e processo inflamatório) da dura-máter e da medula.

3.2.5.1 Avaliação funcional dos animais

A avaliação funcional locomotora dos animais, após a laminectomia, foi realizada antes da realização do procedimento e no sétimo dia após o procedimento experimental, utilizando a Escala BBB.

3.2.5.1.1 Escala de avaliação locomotora BBB (Basso, Beattie e Bresnahan)

A escala de avaliação locomotora BBB foi utilizada como meio de análise dos parâmetros comportamentais, enquanto o rato se locomovia no aparato usado para o teste do campo aberto. Os animais foram classificados por meio de uma escala que variava de 0 a 21 pontos (Tabela 3), refletindo as condições locomotoras dos mesmos, em que o escore 0 estava relacionado com a falta de função motora total do membro e o escore 21 à função motora normal do membro.

Tabela 3: Escala de avaliação locomotora (Basso, Beattie e Bresnahan)

Pontuação	Características	Comentário
0	Não se observam movimentos dos MP.	-
1	Movimentos suaves de uma ou duas articulações de MP.	Suave- <50% da capacidade articular.
2	Movimento extenso de uma articulação e possível movimento suave de outra articulação no MP.	Extenso- ≥50% capacidade articular.
3	Movimento Extenso de duas articulações do MP.	Duas articulações = quadril e joelho, geralmente.
4	Movimentos suaves de todas as três articulações.	Três articulações = quadril, joelho e tornozelo.
5	Movimentos suaves de duas articulações e extensos da 3ª articulação do MP.	-
6	Movimentos extensos de duas articulações e movimento delicado da 3ª articulação do MP.	3ª articulação = tornozelo.
7	Movimentos extensos das três articulações.	-
8	Movimentos suaves, sem suportar o peso do corpo ou a pata apoiada sem suportar o peso do corpo.	Extensão rítmica de três articulações do MP, o tronco se encontra de lado.
9	Apoio plantar com suporte do peso do corpo imóvel ou ocasional, frequente ou consistente suporte do peso do corpo com apoio dorsal.	Suporte do peso = contração do músculo. Extensão do MP durante o apoio plantar da pata ou elevação da bacia imóvel.
10	Passo sustentando o peso do corpo ocasionalmente, sem haver coordenação entre os membros anterior e posterior.	Ocasionalmente >5° e ≤50%. Passos-contato plantar com suporte do peso, o MP avança para restabelecer contato plantar. Coordenação- movimentos simultâneos entre o MP e o membro anterior, alternando entre os lados.
11	De frequentes a consistentes passadas com suporte do peso sem coordenação entre o MP e o membro anterior.	Frequência- 51 a 94% do tempo Consistente- 95 a 100% do tempo.
12	De frequentes a consistentes passadas com suporte do peso do corpo e coordenação ocasional entre os membros anteriores e MP.	60 a 50% de locomoção coordenada.
13	De frequentes a consistentes passadas com suporte do peso e frequente coordenação entre os membros posterior e anterior.	51 a 95% de locomoção coordenada.
14	Consistente coordenação da passada com apoio plantar e posição predominante da pata e de rotação no contato inicial e na elevação, frequentes passadas plantares, consistente coordenação entre o membro anterior e ocasionalmente com apoio dorsal.	Rotação ≥ rotação interna e externa da pata traseira quando apoiada e erguida.
conclusão		
16	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação.	Frequente liberdade do 1º dedo ≥ Há mais da metade das passadas sem ouvir os sons das arranhaduras.

continua

17	Consistente coordenação da passada com apoio plantar, predominante posição em paralelo da pata no contato inicial e na sua elevação.	-
18	Coordenação consistente na passada com apoio plantar e consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação.	Consiste arranhadura de quatro dedos por um período de 4 minutos.
19	Consistente coordenação da passada com apoio plantar e consistente liberação do 1º dedo. Posição paralela da pata no contato inicial e na elevação e o rabo está para baixo, na maior parte do tempo.	Rabo para baixo $\geq$ rabo toca o chão durante as passadas.
20	Consistente coordenação da passada com apoio plantar e consistente liberação do 1º dedo. Posição em paralelo da pata no contato inicial e na elevação, o rabo consistentemente para cima e instabilidade de tronco.	Rabo elevado $\geq$ não toca o chão. Instabilidade do tronco $\geq$ lateralização do tronco quando se vira rapidamente (perda de equilíbrio)
21	Consistentemente coordenada na caminhada, consistente movimento do 1º dedo. Posição da pata paralela no apoio e na elevação. O rabo para cima. Estabilidade consistente do tronco.	Consistente estabilidade do tronco, sem cambalear ou cair, o movimento da bacia e do rabo coordenado com a locomoção

MP= Membro posterior

3.2.6 Avaliação histológica

Os animais foram submetidos à eutanásia sete dias após o procedimento cirúrgico com uma dose excessiva de anestésico (mistura de Xilazina a 20 mg/mL e Quetamina 50 mg/mL). O segmento vertebral correspondente ao local da laminectomia foi retirado em bloco. O arcabouço ósseo foi dissecado manualmente utilizando apenas as meninges e a medula espinhal para análise histológica. Após a retirada do material, os animais foram congelados e encaminhados para incineração juntamente com o descarte biológico do Biotério supracitado.

3.2.7 Confecção das lâminas

As meninges e a medula espinhal foram fixadas em solução de formaldeído a 4%, com tampão fosfato 0,1M e pH 7.4, por sete dias, e temperatura de 4°C. Foi realizada lavagem das peças com álcool 70% para retirar o excesso de formaldeído (Tabela 4).

Tabela 4: Etapas da inclusão dos tecidos para confecção das lâminas de histologia

Procedimento	Solução	Tempo
Desidratação	Álcool 70%	2h
	Álcool 80%	2h
	Álcool 90%	2h
	Álcool 95%	2h
	Álcool 100%	2h
	Álcool absoluto 1	2h
	Álcool absoluto 2	2h
	Álcool absoluto 3	2h
Diafanização	Álcool 100%/Xilol (1:1)	1h
	Xilol 1	1h
	Xilol 2	1h
	Xilol 3	1h
Inclusão	Parafina -1 (60 Graus)	2h
	Parafina -2 (60 Graus)	2h
	Parafina a vácuo (60 Graus)	30 minutos

A orientação do segmento contendo medula e meninges foi realizada de forma a permanecer com a região dorso-lateral para a parte superior do molde de parafina, a fim de uniformizar os cortes. Após a inclusão, a microtomia foi realizada, de forma longitudinal, com o aparelho Leica RM 2065, na espessura de 6 μm , utilizando-se a coloração com hematoxilina/eosina. A desparafinização foi feita com Xilol e a hidratação com cadeia decrescente de etanol (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5: Etapas da desparafinização dos tecidos para confecção das lâminas de histologia

Procedimento	Solução	Tempo
Desparafinar	Xilol 1	5 minutos
	Xilol 2	5 minutos
	Xilol 3	5 minutos
	Xilol/Álcool absoluto (1:1)	2 minutos
	Álcool absoluto 1	2 minutos
	Álcool 95%	2 minutos
	Álcool 90%	2 minutos
	Álcool 80%	2 minutos
	Álcool 70%	2 minutos
	Álcool 50%	2 minutos

Tabela 6: Etapas da confecção das lâminas para análise histológica.

Procedimento	Solução	Tempo (min.)
Coloração	Hematoxilina de Harris	1
Lavagem	Água corrente	5
Coloração	Eosina-floxina	2
	Álcool 95% acetificado 1%	2
Desidratação	Álcool 95%	1
	Álcool absoluto 1	2
	Álcool absoluto 2	2
	Álcool absoluto 3	2
	Álcool absoluto/Xilol (1:1)	2
	Xilol 1	2
	Xilol 2	2
	Xilol 3	2
Montagem	Permunt	-----

Em seguida, as lâminas foram analisadas e avaliada a influência das drogas e do *laser* sobre as meninges e a medula. As imagens de histologia foram registradas utilizando-se um microscópio óptico invertido modelo Axiovert 40-CFL da Carl Zeiss, acoplado a uma câmera digital Axio-Cam MRC de alta resolução, com conjunto de objetivas para aumento de 10, 20, 40 e 100 X, calibradas em escalas micrométricas para os recursos de captação de imagem baseados em contraste de fase, *pladisc* (3D) e emissão de fluorescência.

Para quantificação das regiões marcadas foi utilizado o *software* licenciado Axiovision LE V.4.8.2.0 obtendo-se as áreas de cada região relativa às variáveis do experimento, sendo calculadas automaticamente e convertidas em pixels que permite realizar a contagem de núcleos e de células em cada lâmina.

Um patologista realizou a análise histopatológica, observando a presença de necrose e células inflamatórias. As lâminas foram examinadas em um microscópio de luz, modelo Axiovert 40-CFL da Carl Zeiss, com aumento de 400X. A quantificação do grau do infiltrado inflamatório foi feita da seguinte forma:

- + (menos de 20 células inflamatórias/campo de grande aumento 400X);
- ++ (entre 21 e 50 células/campo de grande aumento 400X);
- +++ (acima de 50 células/campo de grande aumento 400X).

3.2.8 Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise de variância *one-way* ANOVA, e em todos os casos não foram detectadas diferenças entre os tratamentos ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1 Avaliação funcional

Todos os animais foram avaliados e nenhum apresentou *alteração da função motora nos períodos de avaliação*. Todos alcançaram os 21 pontos na avaliação da escala de avaliação locomotora BBB, nos períodos após a recuperação anestésica e no sétimo dia do pós-operatório (168h).

4.2 Avaliação histológica

Na avaliação histológica da PDT sobre a dura-máter, após laminectomia em T10, a quantidade de células inflamatórias e necróticas, em comparação ao grupo controle, foram os parâmetros utilizados na avaliação. As lâminas dos grupos A e B foram analisadas pela contagem de pixels nas colorações de hematoxilina e eosina (Figura 2). Uma cora os núcleos celulares enquanto a outra cora a matriz extracelular, a fim de se avaliar a integridade dos núcleos e das células, respectivamente. Dessa forma, foi comparada a integridade da meninge e dos neurônios (número de núcleos e dos citoplasmas) e a presença de células inflamatórias nos diversos grupos, por meio da contagem de pixels de cada imagem.

Figura 2: Corte histológico corado com Hematoxilina (A) Eosina; (B) após incubação em diferentes amostras: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; **CIAIPc**= ftalocianina de cloro-alumínio e **AM+CIAIPc**= azul de metileno + ftalocianina de cloro-alumínio.

O grupo A foi subdividido em solução fisiológica, azul de metileno, ftalocianina de cloro-alumínio e na mistura de azul de metileno e ftalocianina de cloro-alumínio. Assim, foi possível analisar a neurotoxicidade individual e agrupada das substâncias e compará-lo com o grupo controle (SF). Não foi encontrada diferença significativa ($p < 0,05$) (Figuras 3 e 4).

Figura 3: Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica, corados com eosina, nos diferentes grupos experimentais. **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; **AM+CIAIPc**= azul de metileno + ftalocianina de cloro-alumínio.

Figura 4: Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica, corados com hematoxilina, nos diferentes grupos experimentais: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; a **CIAIPc**= ftalocianina e **AM+CIAIPc**= azul de metileno + ftalocianina de cloro-alumínio.

O grupo B também foi subdividido em solução fisiológica, azul de metileno, ftalocianina de cloro-alumínio, acrescido de *laser*, sendo possível analisar a neurotoxicidade individual e agrupada das substâncias e do *laser* e compará-lo com o grupo controle (SF+*laser*). Não foi observada diferença estatística entre estes grupos acima citados ($p < 0,05$) (Figuras 5 e 6).

Figura 5. Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica, corados com eosina, e aplicação do *laser* nos diferentes grupos: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; a **CIAIPc**= ftalocianina e **AM+CIAIPc**= azul de metileno+ftalocianina de cloro-alumínio.

Figura 6: Comparação entre as porcentagens de área de marcação histológica, corados com hematoxilina, e aplicação do *laser* nos diferentes grupos experimentais: **SF**= solução fisiológica; **AM**= azul de metileno; **CIAIPc**= ftalocianina e **AM+CIAIPc**= azul de metileno+ftalocianina de cloro-alumínio.

4.3 Avaliação histopatológica

A análise histopatológica não revelou necrose tecidual e foi observado infiltrado inflamatório com presença de linfócitos nas seguintes laminae:

- um foco único de inflamação, +/3+, em apenas 1 dos 7 animais do grupo tratado com *laser* e ftalocianina de cloro-alumínio.
- um foco único de inflamação, +/3+, em apenas 1 dos 7 animais do grupo tratado com azul de metileno e ftalocianina de cloro-alumínio, sem o *laser*
- um foco único de inflamação, ++/3+, em apenas 1 dos 7 animais do grupo tratado com *laser* e ftalocianina de cloro-alumínio.
- um foco único de inflamação, +/3+, em apenas 1 dos 7 animais do grupo tratado com *laser* e azul de metileno.

Dessa forma, foi possível realizar as avaliações neurológicas, estruturais e inflamatórias, comparando o grupo experimental ao grupo controle, assim como os seus subgrupos.

5. Discussão

As análises funcional e histológica, por meio da contagem de pixels, e a quantificação histopatológica dos processos para a marcação com hematoxilina e eosina, mostraram que a PDT, utilizando os fármacos PSs, em questão, CIAIPc+AM, não apresentou efeitos neurotóxicos quando aplicados diretamente sobre a dura-máter. Essas avaliações também mostraram que não houve alteração motora, morte celular ou apoptose e não evidenciou atividade inflamatória significativa. Cabe ressaltar que ambos os fotoativos utilizados já possuem um rico histórico de uso na PDT, porém foi a primeira vez que foram aplicados em conjunto na coluna vertebral. Além disso, cada ativo possui características diversas, um muito hidrofílico e outro muito hidrofóbico, que quando nanoveiculados de forma adequada, não originam um novo sistema de fármacos fotoativos interessante, e permite que os mesmos atuem de forma sinérgica no processo de fotoativação, uma vez que sua localização no tecido é diferenciada.

Os dados sobre as aplicações clínicas da PDT são limitados neste contexto biológico, e a maioria dos estudos já realizados com PDT avaliaram sua ação comprovada antineoplásica e antiviral, bem como há relatos de algumas pesquisas clínicas antibacterianas (VURAL; TUĞLU, 2011). Na década de 1970, haviam numerosos ensaios clínicos para o tratamento da herpes simplex nas lesões recorrentes com fotoativação (BOCKSTAHLER; LYTLE; HELLMAN, 1975; DEMIDOVA; HAMBLIN, 2004). Era realizada aplicação tópica de solução de vermelho neutro a 1% seguida por exposição de 15 minutos em lâmpada de tungstênio (incandescente) de 40 W. Os tratamentos, entretanto, foram interrompidos devido a pouca eficácia e possível carcinogenicidade. Na verdade, não se sabia ainda da necessidade de luzes monocromáticas, que garantissem maior absorção pelos fotoativos, e fossem capazes de ativar as vias fotoquímicas e fotobiológicas de resposta celular, com a segurança possível, evitando efeitos colaterais. Em estudos recentes, a PDT com PSs, tais como o ácido 5-aminolevulínico (ALA), derivados da hematoporfirina (Photofrin), talaporfina de sódio, ou m-tetrahidroxifenilclorina (mTHPC) tem provado ser um tratamento adjuvante positivo para pele, cancro e tumores cerebrais no ambiente clínico. Portanto, as propriedades teranóticas da PDT poderiam melhorar o controle da

ação local do reativo produzido durante o tratamento clássico (AGOSTINIS et al., 2011; KOSTRON, 2010; MURAGAKI et al., 2013; PORTILHO et al., 2013). Vários ensaios clínicos com ALA foram realizados em muitos países, ao redor do mundo, em especial no Brasil, na FMRP-USP, com foco nas doenças neoplásicas, com excelentes resultados. O ALA provou ser também eficiente para tratar o molusco contagioso (poxvírus, causada pelo HPV) e o vírus da estomatite vesicular (MYERS et al., 1975). Abdel-Hady et al. (2001) utilizaram ALA-PDT tópica para tratar lesões neoplásicas vulvares, porém observaram resposta de curto prazo em apenas um terço dos casos.

Alguns autores consideram a CIAIPc uma droga fotossensibilizante estável de segunda geração, com comprimentos de onda ideais na melhor parte do espectro eletromagnético (610-660 nm) (NUNES et al., 2004). Esse PS induziu, previamente, a morte celular por apoptose, em gliomas (MIKI et al., 2013).

A CIAIPc é um DTG, quimicamente estável, que apresenta propriedades fotofísicas adequadas (como altos rendimentos quânticos de trigêmeos e meia vida longa) para a PDT (NUNES et al., 2004). Embora a CIAIPc tenha peso molecular elevado, sua natureza hidrofóbica facilita a interação com as camadas bilipídicas, sendo utilizada com sucesso em modelos de câncer, proporcionando margem de segurança pertinente nos ensaios clínicos (BARBUGLI et al., 2010; LONGO et al., 2009; ROCHA et al., 2012). A absorção e a emissão de luz no comprimento de onda longa e o sistema nano (10^{-9}) de entrega de drogas PS viabilizam o alcance de lesões mais profundas (NYMAN; HYNNINEN, 2004). Sua estrutura química contém uma variedade de íons de metal, responsáveis pela propriedade particular de cada molécula. O alumínio (III) e o zinco (II) são dois íons metálicos usados para melhorar a fototoxicidade. Além disso, outra vantagem dos corantes à base de ftalocianinas é que eles podem ser seletivamente acumulados dentro da célula e eliminados de forma muito mais eficiente a partir do tecido alvo, com quase ausência de fluorescência, observada nas células 24 h após a administração do fármaco (ABDEL-HADY et al., 2001; MIKI et al., 2013).

Atualmente é reconhecido que o desenvolvimento de um novo sistema de administração de fármacos transportadores de PSs clássicos pode aumentar as vantagens da PDT, como recentemente demonstrado na literatura. Entre os

sistemas disponíveis, o lipossoma foi provavelmente o mais simples e biocompatível e, por conseguinte, tem sido proposto para transportar e fornecer PSs. Essa estratégia baseou-se na premissa de que os lipossomas são preferencialmente absorvidos pelo tumor local e pelos vasos circunvizinhos (ALLEN et al. 2002; DURMUŞ; NYOKONG, 2008). Nesse contexto, esses estudos mostraram os efeitos de uma CIAIPc lipossomal utilizada na formulação da PDT nas células de câncer bucal. Esses resultados demonstraram que a PDT e a CIAIPc, na alta citotoxicidade produzida em culturas de células do câncer bucal, reduziu significativamente a proliferação celular. Os autores também analisaram as diferentes características de necrose nas células tratadas. Considerados em conjunto, esses dados sugerem boas perspectivas para o uso clínico da PDT, do AM e da CIAIPc (PROFFITT et al., 1983; SADZUKA et al., 2007).

A avaliação funcional por meio da escala de avaliação motora de BBB demonstrou que não houve lesão neurológica em nenhum animal. Esses resultados indicam que a aplicação do *laser* e dos PSs não provocaram alterações funcionais nas meninges e nos neurônios. A PDT foi utilizada no tratamento de lesão medular com CIAIPc excitada pela luz infravermelha, o que reduziu a densidade de células gliais no epicentro da lesão. Consequentemente, esse método inibiu a formação de cicatriz glial e diminuiu a chance de *déficit* neurológico (Li et al., 2011).

As análises histológica e histopatológica das lâminas, por meio da contagem de pixels, revelaram que não houve danos estruturais significativos na dura-máter e nos neurônios. A contagem de pixels mostrou que o número de núcleos celulares e de células (membranas citoplasmáticas integras) se manteve semelhante nos subgrupos, quando os PSs foram aplicados de maneira isolada ou agrupados (Figuras 2 a 5), e não se observou morte celular ou apoptose. Ao exame microscópico, não foi detectada atividade inflamatória significativa. Somente se constatou infiltrado inflamatório linfocitário focal, em pequena quantidade, em quatro lâminas, como descrito na análise histopatológica. A PDT, utilizando a porfirina catiônica, inativou a *candida albicans* pela lesão da membrana citoplasmática. As imagens de microscopia eletrônica mostraram claramente que o dano induzido procedeu da face exterior da membrana

citoplasmática para a interna. As imagens de fluorescência confocal evidenciaram que um fluxo maciço ocorreu após a morte celular (LAMBRECHTS; AALDERS; VAN MARLE, 2005). A redução do número de bactérias, mediada pela PDT, na ferida de queimadura, foi rápida (menos do que uma hora) em comparação com uma terapia padrão (sulfadiazina de prata creme), que levava vários dias para realizar o tratamento. A segmentação celular pelo PS impediu a recolonização e exerceu efeito protetor aos tecidos (LAMBRECHTS et al., 2005a).

A PDT, utilizando CIAIPc e AM, mostrou-se segura sobre a dura-máter e não causou alterações neurotóxicas significativas. Sua aplicação no tratamento de patologias extradurais pode ser uma ferramenta de grande utilidade e um campo a ser explorado.

As limitações deste estudo foram: ausência de estudos comparativos na literatura, vasto número de PSs, tipos de *lasers* com características similares e o pequeno número de animais utilizados.

Para maior detalhamento do experimento serão necessários mais estudos com imuno-histoquímica e microscopia eletrônica, a fim de aprofundar a análise das interações da PDT e dos PSs sobre a dura-máter e o tecido neural.

Os resultados observados no estudo demonstraram que a utilização da terapia fotodinâmica, quando utilizados o azul de metileno e a ftalocianina de cloro-alumínio, sobre a dura-máter não induziu alterações histológicas relacionadas com efeitos nocivos e também não foi observada alteração das funções motoras dos animais. A ausência de efeitos nocivos da utilização da PDT indica que a essa modalidade de tratamento apresenta potencial de utilização no âmbito da coluna vertebral e pode abrir novas oportunidades de tratamento das doenças relacionadas com a coluna vertebral.

Com estas observações, foi possível deduzir que a PDT, a CIAIPc e o AM apresentam excelentes perspectivas para a sua utilização em ensaios clínicos.

6. Conclusão

Após a análise dos resultados pelas avaliações neurológica e histopatológica e pela comparação dos pixels, concluiu-se que a PDT com AM e CIAIPc não causa neurotoxicidade quando aplicada sobre a dura-máter nos ratos da raça Wistar.

7. Referências Bibliográficas

ABDEL-HADY, E. S. et al. Immunological and viral factors associated with the response of vulval intraepithelial neoplasia to photodynamic therapy. **Cancer Res.** v. 61, n.1, p. 192-6, Jan 2001.

AGOSTINIS, P. et al. Photodynamic therapy of cancer: an update. **CA Cancer J Clin.** v. 61, n. 4, p. 250-81, Jul-Aug 2011.

ALLEN, C. M. et al. Photodynamic properties of amphiphilic derivates of aluminum tetrasulfophthalocyanine. **Photochem Photobiol.** v. 76, n. 2, p. 208-16, Aug 2002.

ALLISON, R. R. et al. Photosensitizers in clinical PDT. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 1, n. 1, p. 27-42, May 2004.

BARBUGLI, P. A. et al. In vitro phototoxicity of liposomes and nanocapsules containing chloroaluminum phthalocyanine on human melanoma cell line. **J Nanosci Nanotechnol.** v. 10, n. 1, p. 569-73, Jan 2010.

BOCKSTAHLER, L. E.; LYTLE, C. D.; HELLMAN, K. B. A review of photodynamic therapy for herpes simplex: benefits and potential risks. **N Y J Dent.** v. 45, n. 5, p. 148-57, May 1975.

BOYLE, R. W.; DOLPHIN, D. Structure and biodistribution relationships of photodynamic sensitizers. **Photochem Photobiol.** v.64, n.3, p. 469-85, Sep 1996.

BRANCALEON, L.; MOSELEY, H. Laser and non-laser light sources for photodynamic therapy. **Lasers Med Sci,** v. 17, n. 3, p. 173-86, 2002.

BUYTAERT, E.; DEWAELE, M.; AGOSTINIS, P. Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. **Biochim Biophys Acta.** v. 1776, n. 1, p. 86-107, Sep 2007.

CASTANO, A. P.; DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Mechanisms in photodynamic therapy: part two-cellular signaling, cell metabolism and modes of cell death. **Photodiagnosis Photodyn Ther.** v. 2, N. 1, p. 1-23, Mar 2005.

DEMIDOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Photodynamic therapy targeted to pathogens. **Int J Immunopathol Pharmacol.** v. 3, n. 17, p. 245-54, Sep-Dec 2004.

DEMINOVA, T. N.; HAMBLIN, M. R. Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 49, n. 6, p. 2329-35, Jun 2005.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photoradiation therapy for the treatment of malignant tumors. **Cancer Res.** v. 38, n. 8, p. 2628-35, Aug 1978.

DOUGHERTY, T. J.; MARCUS, S. L. Photodynamic therapy. **Eur J Cancer.** v. 28A, n. 10, p. 1734-42, 1992.

DOUGHERTY, T. J. et al. Photodynamic therapy. **J Natl Cancer Inst.** v. 90, n. 12, p. 889-905, Jun 1998.

DURMUŞ, M.; NYOKONG, T. Photophysicochemical and fluorescence quenching studies of benzyloxyphenoxy-substituted zinc phthalocyanines. **Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectr.** v. 69, n. 4, p. 1170-7, Apr 2008.

FIGGE, F. H.; WEILAND, G. S.; MANGANIELLO, L. O. Cancer detection and therapy; affinity of neoplastic, embryonic, and traumatized tissues for porphyrins and metalloporphyrins. **Proc Soc Exp Biol Med.** v. 68, n. 3, p. 640, 1948 Jul-Aug 1948.

GAD, F. et al. Effects of growth phase and extracellular slime on photodynamic inactivation of gram-positive pathogenic bacteria. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 48, n. 6, p. 2173-8, Jun 2004.

HAUSMAN, W. Die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins. **Biochem Z.** v. 30, p. 276-316, 1911.

KESSEL, D.; THOMPSON, P. Purification and analysis of hematoporphyrin and hematoporphyrin derivative by gel exclusion and reverse-phase chromatography. **Photochem Photobiol.** v. 46, n. 6, p. 1023-5, Dec 1987.

KOSTRON, H. Photodynamic diagnosis and therapy and the brain. **Methods Mol Biol.** v. 635, p. 261-80, 2010.

LAMBRECHTS, S. A. et al. Effect of albumin on the photodynamic inactivation of microorganisms by a cationic porphyrin. **J Photochem Photobiol B.** v. 79, n. 1, p. 51-7, Apr 2005a.

LAMBRECHTS, S. A. et al. Photodynamic therapy for *Staphylococcus aureus* infected burn wounds in mice. **Photochem Photobiol Sci.** v. 4, n. 7, p. 503-9, Jul 2005b.

LAMBRECHTS, S. A.; AALDERS, M. C.; VAN MARLE, J. Mechanistic study of the photodynamic inactivation of *Candida albicans* by a cationic porphyrin. **Antimicrob Agents Chemother.** v. 49, n. 5, p. 2026-34, May 2005.

LI, Q. et al. Photodynamic therapy as a potential treatment for spinal cord injury. **Med Hypotheses.** v. 77, n. 1, p. 58-9, Jul 2011.

LIPSON, R. L.; BALDES, E. J. The photodynamic properties of a particular hematoporphyrin derivative. **Arch Dermatol.** v. 82, p. 508-16, Oct 1960.

LONGO, J. P. et al. Photodynamic therapy with aluminum-chloro-phthalocyanine induces necrosis and vascular damage in mice tongue tumors. **J Photochem Photobiol B.** v. 94, n. 2, p. 143-6, 2009.

LONGO, J. P. F.; AZEVEDO, R. B. Efeito da terapia fotodinâmica mediada pelo azul de metileno sobre bactérias cariogênicas. **Rev Clín Pesq Odontol.** v. 6, n. 3, p. 249-57, Set-Dez 2010.

LUKSIENE, Z. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. **Medicina (Kaunas).** v. 39, n. 12, p. 1137-50, 2003.

MACHADO, A. E. H. Terapia fotodinâmica: princípios, potencial de aplicação e perspectivas. **Quím. Nova [online].** v. 23, n. 2, p. 237-43, 2000.

MAROTTI, J. et al. Decontamination of dental implant surfaces by means of photodynamic therapy. **Lasers Med Sci.** v. 28, n. 1, p. 303-9, Jan 2013.

MIKI Y. et al. Photodynamic therapy in combination with talaporfin sodium induces mitochondrial apoptotic cell death accompanied with necrosis in glioma cells. **Biol Pharm Bull.** v. 36, n. 2, p. 215-21, 2013.

MURAGAKI, Y. et al. Phase II clinical study on intraoperative photodynamic therapy with talaporfin sodium and semiconductor laser in patients with malignant brain tumors. **J Neurosurg.** v. 119, n. 4, p. 845-52, Oct 2013.

MYERS, M. G. et al. Failure of neutral-red photodynamic inactivation in recurrent herpes simplex virus infections. **N Engl J Med.** v. 293, n. 19, p. 945-9, Nov 1975.

NUNES, S. M. T.; SGUILLA, F. S.; TEDESCO, A. C. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 37, n. 2, p. 273-84, Feb 2004.

NYMAN, E. S.; HYNINEN, P. H. Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. **J Photochem Photobiol B.** v. 73, n. 1-2, p. 1-28, Jan 2004.

OLIVEIRA, D. M. et al. Zinc phthalocyanine/magnetic fluid complex: a promising dual nanostructured system for cancer treatment. **J Nanosci Nanotechnol.** v. 6, n. 8, p. 2432-7, Aug 2006.

PORTILHO, F. A. et al. Antitumor activity of photodynamic therapy performed with nanospheres containing zinc-phthalocyanine. **J Nanobiotechnology.** v. 11, p. 41, Dec 2013.

PROFFITT, R. T. et al. Tumor-imaging potential of liposomes loaded with IN-111-NTA - biodistribution in mice. **J Nucl Med.** v. 24, p. 45-51, 1983.

RICH, T.; ALLEN, R. L.; WYLLIE, A. H. Defying death after DNA damage. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 777-83, Oct 2000.

ROCHA, M. S. et al. Aluminum-chloride-phthalocyanine encapsulated in liposomes: activity against naturally occurring dog breast cancer cells. **J Biomed Nanotechnol.** v. 8, n. 2, p. 251-7, Apr 2012.

SADZUKA, Y. et al. Study on liposomalization of zinc-coproporphyrin I as a novel drug in photodynamic therapy. **Int J Pharmacol.** v.338, n. 1-2, p. 306-9, Jun 2007.

TAPAJÓS, E. C. et al. In vitro photodynamic therapy on human oral keratinocytes using chloroaluminum-phthalocyanine. **Oral Oncol.** v. 44, n.11,p.1073-9,Nov 2008.

TARDIVO, J. P. et al. Review: Methylene blue in photodynamic therapy: From basic mechanisms to clinical applications. **Photodiagn. Photodyn. Ther.** v. 2, n. 3, p. 175-191, Sep 2005.

VURAL, K.; TUĞLU, M. Neurotoxic effect of statins on mouse neuroblastoma NB2a cell line. **Eur Rev Med Pharmacol Sci.** v. 15, n. 9, p. 85-91, Sep 2011.

WAINWRIGHT, M. Non-porphyrin photosensitizers in biomedicine. **Chem. Soc. Rev.** v. 25, p. 351-359, 1996.

8. Anexo

APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

— Comissão de Ética no Uso de Animais —
(16)3602-3301

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo para Uso de Animais em Experimentação nº 005/2014, sobre o projeto intitulado "*Efeitos neurotóxicos da terapia fotodinâmica antimicrobiana sobre duramater - estudo in vivo*", sob a responsabilidade do **Professor Doutor Helton Luiz Aparecido Defino** está de acordo com os Princípios Éticos em Experimentação Animal adotado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi **APROVADO** em reunião de 30 de junho de 2014.

We certify that the protocol nº 005/2014, entitled "*Neurotoxic effects of antimicrobial photodynamic therapy on duramater - study in vivo*", is in accordance with the Ethical Principles in Animal Research adopted by the National Council for the Control of Animal Experimentation (CONCEA) and was approved by the Local Animal Ethical Committee from the School of Medicine of Ribeirão Preto of the University of São Paulo in 06/30/2014.

Ribeirão Preto, 30 de junho de 2014.

Prof. Dr. Omero Benedicto Poli-Neto
Presidente da CEUA – FMRP - USP